RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIII. FASC. IV.

Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia

I TOSSICI PELLAGROGENI

in rapporto colle diverse sostanze alimentari e colle stagioni dell' anno

DEL

Dott. CARLO CENI
Direttore dei Laboratori scientifici

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1907.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIII. FASC. IV.

Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia

I TOSSICI PELLAGROGENI

in rapporto colle diverse sostanze alimentari e colle stagioni dell' anno

DEL

Dott. CARLO CENI
Direttore dei Laboratori scientifici

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1907.

(616 $\frac{86}{969}$)

Una delle obbiezioni che più di frequente si fa al concetto tossico-parassitario da me sostenuto nell' etiologia della pellagra, si è che i parassiti specifici si possono riscontrare in molte sostanze alimentari che servirebbero loro di veicolo per entrare nell' organismo (p. es. nelle frutta guaste, nello stracchino di Gorgonzola, ecc.), l' uso delle quali non ha mai presentato dei rapporti speciali con questa malattia.

Nelle mie precedenti pubblicazioni sull' attività tossica dei parassiti pellagrogeni, già più volte feci notare come questa può variare non solo colla natura del mezzo nutritivo su cui i funghi si sviluppano; ma anche colle diverse condizioni in cui uno stesso mezzo nutritivo viene usofruito. Esponendo i miei primi reperti sulle proprietà tossiche dell' *Aspergillus fumigatus* ho insistito p. es. sul fatto, che questo ifomiceta, a parità di condizioni d' ambiente, può crescere sulle cariossidi di *mais*, tossico o atossico a seconda del grado di minore o maggiore idratazione del cereale stesso.

Altrove, col Dott. Besta, trattando del *Penicillium glaucum*, facevo pure osservare come quest' altro ifomiceta non di rado nelle nostre esperienze si fosse presentato meno tossico sul *mais*, che sul liquido Raulin.

Osservazioni molto simili furono fatte anche da altri ricercatori, specie variando la composizione dei substrati artificiali. Paladino Blandini, assistente ai Laboratori del Gosio, dà poi tanta importanza alla natura del mezzo nutritivo, che in una sua recente pubblicazione, improntata forse un po' troppo a un evidente spirito di contraddizione [1], arriva perfino a sostenere che

[1] Nel campo della etiologia della pellagra ecc. Questa *Rivista*. Vol. XXXIII. Fasc. II.-III.

le stesse oscillazioni da me osservate fin qui nell' attività tossica delle muffe pellagrogene nelle diverse stagioni dell' anno non possono, in gran parte almeno, che dipendere da eventuali modificazioni avvenute nel liquido di Raulin, al quale io ho ricorso quale mezzo nutritivo costante. L' aver io adoperato, almeno nelle ultime ricerche sul ciclo biologico dei penicilli in rapporto colle stagioni, lo stesso liquido colturale preparato una volta per tutte all' inizio delle esperienze, constituirebbe secondo questo autore, un così grave errore da compromettere seriamente i risultati delle esperienze. In conseguenza della sua lunga conservazione, questo liquido, per azione della luce e dell' ossigeno atmosferico, andrebbe soggetto, sostiene egli, a lente, ma continue e così marcate modificazioni, da renderlo capricciosamente ora un terreno colturale adatto, ora disadatto per simili ricerche.

In appoggio a queste sue affermazioni cita i nomi autorevoli di Raulin e di Pasteur, che sperimentalmente dimostrarono (cosa che non ha nulla a che fare colla tossicità) la sensibilità squisita in genere delle muffe ai diversi agenti fisici e chimici.

Senza entrare a discutere le ipotesi di questo autore che fino a prova dimostrativa io dovrò giudicare quale parto della sua fervida fantasia, solo a titolo di curiosità faccio qui notare quanto egli discordi in ciò dal suo maestro, Prof. Gosio, il quale all' ultimo Congresso Pellagrologico in Milano trovava invece che un grande coefficiente d' errore delle mie ricerche pubblicate fino allora sullo stesso argomento, doveva consistere nell' aver io adoperato quale mezzo colturale del liquido Raulin preparato volta per volta nei singoli periodi dell' anno. Il Gosio, se la memoria non m' inganna, avvalorava le sue obbiezioni ricordando pure i succitati studi di Raulin e Pasteur, e veniva così ad ammettere come sia presso a che impossibile in pratica preparare, in due tempi diversi, due campioni di liquido Raulin eguali nella loro costituzione chimica....!?

A simili obbiezioni e ad altre più o meno serie che il Paladino nella sopra ricordata pubblicazione muove ai miei lavori sul rapporto tra l' attività tossica delle muffe pellagrogene e le stagioni dell' anno, mi riservo di rispondere più tardi, contrapponendo nuovi dati di ricerche in corso su tale argomento. Però non posso a meno di far rilevare fin d'ora alcune inesattezze nelle citazioni dei miei lavori (escludo la malafede), non che la

superficialità della critica e delle argomentazioni di questo egregio mio contradditore.

Per ciò che concerne l' esagerata importanza ch' egli vuol dare alla diversa natura dei mezzi colturali a spiegazione dei risultati da me ottenuti sulla tossicità delle muffe nelle diverse epoche dell' anno, mi rimetto alle conclusioni delle ricerche che riassumo nella presente nota; convinto che queste vengano a dare un' idea obbiettivamente abbastanza esatta dell' influenza che esercitano i diversi terreni colturali sull' attività tossica di questi funghi, di fronte a quella esercitata su di essi dalle stagioni.

Le variazioni della temperatura che si hanno nelle diverse stagioni, prosegue il sopramenzionato autore, possono aver pure grandemente influito sulle oscillazioni della tossicità da me osservate; ma le stagioni per se stesse, egli afferma nel modo più categorico, non possono avere alcuna importanza in questi fenomeni. « Troppo comodo, egli aggiunge, sarebbe invocare le influenze cosmo-telluriche, vera pietra filosofale dei nuovi alchimisti del secolo XX ecc., per spiegare fenomeni di tanta importanza ».

Anzi tutto confesso che non saprei veramente come scindere il concetto di una stagione dalla sua rispettiva temperatura; per cui più che di « pietra filosofale » sembrami che questo autore dovrebbe pur persuadersi che si tratta quì di una questione di buon senso.

Basterà poi dare uno sguardo alle diverse mie pubblicazioni su questo argomento, per convincersi facilmente ch' io non solo non ho mai inteso e non intendo eliminare l' influenza della temperatura, propria delle diverse stagioni, sui risultati delle mie esperienze, come il mio egregio contradditore con abilità da giocoliere cerca di far credere; ma che io anzi, assai prima di lui, richiamai sul valore di essa l' attenzione. Esponendo i risultati ottenuti coll' *Aspergillus fumigatus*, coltivato a temperature diverse nelle varie epoche dell' anno, già affermavo che la tossicità di questo fungo non poteva ritenersi in esclusivo rapporto colla temperatura necessaria al suo sviluppo; ma bensì con tutto quel complesso di fenomeni naturali (non esclusa la temperatura) che costituiscono le stagioni. In seguito, riferendo i risultati avuti con altre specie di Aspergilli (*ochraceus, varians*, gigante bruno) e coi Penicilli verdi, ben lungi dal disconoscere la parte che ha la temperatura sulle oscillazioni della tossicità

delle muffe nelle varie epoche dell' anno, più volte ho fatto invece rimarcare come tali oscillazioni persistono anche quando nelle stagioni fredde si favorisce lo sviluppo delle muffe coltivandole alla stufa. Alla temperatura ambiente del nostro clima in questi casi le muffe risultarono poi evidentemente sempre ancor meno tossiche che alla temperatura della stufa. Ho però fatto notare a tale proposito come da noi nell' inverno la massima parte delle muffe da me studiate a temperatura ambiente o non crescevano affatto o crescevano assai male, senza sporificare ecc. È questa anzi la ragione principale, dissi fin d' allora, per cui nelle stagioni fredde ricorsi anche alla temperatura riconosciuta quale *optimum* per lo sviluppo delle varie muffe. Ma di tutto ciò il Paladino non ritiene opportuno tener conto e riporta oggi, dopo qualche anno dalle mie, le sue esperienze fatte a temperature diverse, quale una geniale trovata e irrefragabile dimostrazione contro un possibile rapporto fra tossicità e stagioni.

Protestando ironicamente contro le credenze nell' influenza delle stagioni sui fenomeni naturali in genere, riporta egli i risultati delle sue ricerche coll' audace presuzinone di aver scoperto che tutto si riduce ad effetto di temperatura.

Il Paladino, difende la sua tesi sostenendo che perfino i risultati di alcune mie esperienze parlano contro un' influenza delle stagioni. Egli si riferisce qui a quei pochi campioni di muffe che, da me coltivate alla stufa, diedero tossici anche nell'inverno, come credo voglia riferirsi ad altri che diedero pure dei tossici egualmente nell' estate, nella primavera e nell' autunno. A questa obbiezione non mi resta di rispondere che ripetendo quanto già in altra occasione ebbi a dire a questo autore (vedi mia nota su di un Aspergillo gigante bruno, in questa *Rivista*, 1906); cioè, che le mie conclusioni sono tratte dal complesso dei numerosi risultati avuti sperimentando su parecchie specie e varietà di muffe; ma non già desunte da esperienze eseguite su di una singola specie o varietà; come appunto fin qui si era fatto da chi si occupava di pellagra.

Del resto le eccezioni a cui accenna il Paladino, più che in danno, credo che vengano in vantaggio della mia tesi; giacchè esse dopo tutto non sono così in dissonanza aperta, com' egli vuol lasciar intravedere, col decorso della stessa endemia pellagrosa. Se questa, infatti, presenta, come è risaputo, le fasi di massima recrudescenza in primavera e in autunno, ciò non

vuol dire che manchino casi di pellagra anche in altre stagioni. Io vidi nel nostro Istituto, nel periodo di circa 10 anni, perfino dei casi di pellagra acuta non solo nell' estate, ma anche nell' inverno e sopratutto nel febbraio di alcuni anni in cui la buona stagione favoriva anche un germogliare precoce della natura.

Un caso tipico di tifo pellagroso invernale fu descritto anche dal Belmondo, verificatosi pure nel nostro Istituto nel febbraio 1889 [1]; mentre anche dalle preziose osservazioni di questo autore risulta evidente che questa forma grave è quasi esclusiva della primavera avanzata.

Ho voluto citare l' esempio di eccezioni alla regola nel decorso clinico di questa forma speciale di pellagra, pel valore non indifferente che vengono ad acquistare nella questione della genesi di questa malattia; non potendo in questi casi esistere dubbio alcuno sul rapporto diretto tra i sintomi morbosi e la causa della malattia stessa.

Infine vorrei poi che il mio egregio contradditore nella citazione di quei casi di muffe da me studiate nelle varie stagioni e che sarebbero, seconda lui, in così aperta contraddizione colle mie conclusioni, fosse un po' più esatto.

Per esempio, citando i risultati da me ottenuti coll' Aspergillo bruno gigante sopra ricordato, il Paladino afferma che questo ifomiceta avrebbe dato dei tossici tetanizzanti tanto nel mese autunnale di novembre, quanto in quello invernale di febbraio. Ebbene, basterà vedere la conclusione 3ª di quella mia monografia, nella quale insisto invece nell'affermare che questo fungo in tutto il periodo d'esperimento mi diede solo tossici d'azione deprimente e paralizzante e non mai tossici di natura tetanizzante, per farsi un concetto della serietà con cui il sullodato autore conduce la sua polemica.

Un nuovo coefficiente, e forse questo il più grave, che avrebbe contribuito alle oscillazioni della tossicità da me osservata nelle diverse stagioni, consisterebbe, sempre secondo il Paladino Blandini, nell' aver io ricorso in queste esperienze a colture vecchie approntate due volte l' anno.

[1] Le alterazioni anatomiche del midollo spinale nella pellagra e loro rapporto coi fatti clinici. *Rivista Sperim. di Fren.* Vol. XV-XVI. 1889-90.

Sarei in tal modo incorso nel grave errore della nota legge sui micro-esseri, che nei ripetuti innesti finiscono per perdere i loro caratteri primitivi. Cita per ciò l'esempio classico di Schiottelius che con innesti di prodigioso fatto da culture troppo vecchie arrivò ad ottenere delle varietà prive della caratteristica proprietà cromogena.

A tale proposito ricorderò soltanto che le mie colture erano tutte a un dipresso della stessa età; mentre i risultati avuti nelle varie epoche, furono quasi sempre diversi ed opposti. Se la legge invocata dal Paladino potesse avere un valore negativo nelle mie esperienze, mi domando io come egli potrebbe allora spiegare il fenomeno avveratosi le mille volte, di innesti, fatti anche sempre dalla medesima coltura, i quali rimasero atossici per più mesi nei primi assaggi; mentre divennero poi tossici negli assaggi successivi, quando, cioè, la cultura madre era assai più invecchiata.

Siamo qui davanti a un fenomeno che è in perfetta contraddizione con una legge elementare sui micro-esseri; ma che pure è un fatto e come tale noi dobbiamo rispettarlo.

Nella foga della sua polemica, il Paladino dimentica poi affatto le mie esperienze sull' *Aspergillus fumigatus*, eseguite, com' egli vorrebbe, con seminagioni fatte da colture recenti, da campioni del fungo che isolavo man mano nelle diverse stagioni, all' epoca, cioè, delle singole esperienze. Eppure anche con questo metodo i risultati mi condussero alle stesse conclusioni, ad ammettere, cioè, un' influenza delle stagioni sull' attività tossica delle muffe pellagrogene.

Il Paladino si arrabatta infine a difendere il suo erroneo concetto sull' enorme diversità individuale nel modo di reagire dei tossici pellagrogeni da lui già altrove sostenuto e ch' egli quì pure nuovamente invoca quale coefficiente d' errore delle mie esperienze sui rapporti tra tossicità e stagioni. Egli si basa sempre sui risultati della ormai sua celebre esperienza, eseguita mettendo a contatto della corteccia cerebrale di un piccione, il siero di sangue di un cane rimasto indifferente alla iniezione di estratti alcoolici di muffe, ma che secondo lui invece dovevano essere certamente tossici...!

Già il Besta, nel mio laboratorio, mediante opportune ricerche di confronto, fatte con iniezioni intracraniche di diversi

sieri e d' acqua distillata, dimostrò ampiamente quanto fallace sia questo metodo di ricerca e fece osservare come gli effetti ottenuti dal Paladino nel piccione non possono affatto attribuirsi alla presenza nel sangue di tossici specifici pellagrogeni. Ora io mi domando solo se la corteccia cerebrale degli uccelli e in modo speciale quella dei piccioni sia realmente dotata di una così squisita sensibilità, da giustificare questo metodo che si vorrebbe ritenere tanto preciso e decisivo in una questione così seria e così complessa. Tra i fisiologi è anzitutto sempre aperta la discussione se il cervello degli uccelli in genere rappresenti in realtà, come nei mammiferi, un organo di moto e di senso (Flourens, Rolando, Munk, Schrader, Luciani, ecc). Otto Kalischer poi, nei suoi magistrali lavori sulla fisiologia e anatomia comparata del cervello, conclude che il piccione pei suoi centri corticali poco differenziati e quasi nulla affatto eccitabili, sia da ritenersi tra i meno evoluti degli uccelli. Io stesso ho ripetuto le esperienze di questo autore sul cervello di piccioni e di polli, e confesso che non avrei mai creduto di trovarmi davanti a un organo quasi ineccitabile alle correnti galvanica e faradica e insensibile affatto ai più forti reagenti chimici (potassa caustica, acido cloridrico, acido fenico ecc).

Il Paladino e il Gosio, che anche recentemente ricorsero alle iniezioni intracraniche nei piccioni, di siero di sangue di pellagrosi, colla pretesa di avere così un dato preciso per la diagnosi precoce della pellagra (memoria presentata al concorso Pezzini-Cavallotti, Padova), vedono quindi che le cose non sono tanto semplici), quanto essi se le immaginano.

Il Paladino già in un suo lavoro precedente si aggrappava a una reazione diversa ed opposta degli animali, anche della stessa specie, ai veleni pellagrogeni, per negare allora l' esistenza dei due tipi d' azione diversa ed opposta da me e dal Besta dimostrati. Ebbene, se egli vuole persuadersi che in realtà è erroneo questo suo concetto sulla reazione individuale degli animali, potrebbe sperimentare a breve distanza sopra un medesimo soggetto i tossici d' azione eccitante e convulsivante e quelli d' azione deprimente e paralizzante, iniettando i secondi, per es. quando già sono apparsi i fenomeni caratteristici prodotti dai primi.

Io ho già ripetuto parecchie volte l' esperienza sui cani, anche con piccole dosi di tossici, e ho sempre constatato che,

invece di un' esagerazione dei sintomi determinati dall' iniezione dei primi, come si dovrebbe avere secondo il concetto del Paladino, si ha al contrario, colla seconda iniezione, un quadro d'intossicamento a carattere misto. Se poi la quantità dei tossici inoculati in secondo tempo è superiore alla prima, i fenomeni di coma e di depressione finiscono per prevalere completamente su quelli a carattere d'eccitamento, sui tremori e anche sulle convulsioni.

Con ciò credo di aver risposto alle principali obbiezioni mosse dal Paladino alle mie ricerche sulla tossicità delle muffe pellagrogene in rapporto alle varie stagioni dell' anno. A suo tempo mi riservo, come già dissi, di ritornare sull' argomento coll' aiuto di nuovi reperti di ricerche in corso.

Questo autore accenna infine anche ai risultati negativi ottenuti dagli sperimentatori con muffe pellagrogene cresciute in località non pellagrogene, come p. es. quelli dell' Otto di Freiburg e dello Sturli di Vienna e ch'io credetti di poter mettere in rapporto colle condizioni dell'ambiente. Anche questi risultati, naturalmente secondo lui, non sarebbero invece dovuti che a cause d' errore di quella tecnica, della quale egli sembrerebbe l'unico legittimo possessore. In appoggio al suo preconcetto riporta alcune confidenziali comunicazioni orali fatte di recente al Gosio dallo Sturli, le quali distruggerebbero ogni valore dei primi risultati da questo autore già pubblicati e ottenuti con muffe provenienti dal mio laboratorio e da quello del Gosio stesso.

Non credo il caso di discutere del metodo audace a cui ricorre il Paladino per confutare fatti di tanta importanza. Attenderò invece, per riprendere quest' ultima questione, che i reperti dello Sturli vengano resi di pubblica conoscenza e in tutti i loro particolari.

Mi permetto qui a ogni modo di dire che l' egregio collega di Vienna ebbe pure la cortesia di comunicare oralmente anche a me i suoi più recenti risultati; ma che non mi sembra finora affatto di vedere in essi alcuna contraddizione stridente nè coi suoi primi, ne tanto meno coi miei come sosterebbe il Paladino.

Dopo questa digressione, della quale chiedo venia all'indulgente lettore, eccomi all' oggetto principale dell' attuale pubblicazione, che ha per scopo di mettere in rilievo l' influenza della natura diversa del mezzo nutritivo sull' attività tossica delle muffe pellagrogene, di fronte specialmente a quella che esercitano sulla medesima attività le stagioni dell' anno.

Queste mie ricerche si dividono in due gruppi: quelle del primo sono rivolte a stabilire il potere tossico dei parassiti cresciuti in natura su alcune delle sostanze alimentari su cui si riscontrano più di frequente; quelle del secondo sono rivolte a stabilire il potere tossico di parassiti fatti sviluppare artificialmente su diverse sostanze alimentari previamente sterilizzate.

Al primo gruppo di esperienze appartengono alcuni assaggi fatti del potere tossico del *Penicillium glaucum* sviluppatosi in natura su limoni e su mele, non che sullo stracchino di Gorgonzola. I risultati di questi assaggi naturalmente, per quanto nelle condizioni più favorevoli per uno studio pratico della questione, non potrebbero però avere che un valore limitato, non essendo qui possibile escludere cause d' errori dovute alla presenza di altri parassiti che sulle sopra dette sostanze si sviluppano in natura contemporaneamente ai germi che sono oggetto speciale delle mie ricerche. É solo infatti perchè tali risultati presentano, come vedremo, una notevole concordanza fra di loro nelle varie epoche in cui furono ripetute le esperienze, ch' io credo opportuno di renderli qui di pubblica conoscenza.

Le ricerche sulle frutta le ho fatte su notevole quantità di materiale che raccoglievo nei depositi alimentari del nostro Istituto, scegliendo di solito quei limoni e quelle mele che trovavo più guaste o ricoperte in tutto e in parte da muffe identificate al microscopio per *Penicillium glaucum.* Queste frutta, (nel numero di circa 30-40 per volta) venivano immerse in un litro d' alcool ordinario e lavate mediante uno spazzolino; in modo da asportarne più che era possibile la muffa che le ricopriva. Dall' alcool di lavaggio, che di solito si riduceva a una poltiglia verde scura, facevo l' estrazione dei tossici.

L' esperienza sulle mele fu ripetuta per cinque volte e precisamente nei mesi di Ottobre, Novembre e Dicembre 1906 e nei mesi di Marzo e Aprile 1907. Nelle prime quattro esperienze gli estratti alcoolici iniettati abbondantemente in animali (cani e cavie) non diedero luogo ad alcun sintoma d' intossicamento. Nell' ultima esperienza, in quella dell' Aprile, gli estratti diedero luogo tanto nelle cavie, quanto nei cani a lievi fenomeni di depressione che durarono poche ore e nulla di più.

Le esperienze sui limoni diedero quasi sempre risultati completamente negativi per cinque volte, e precisamente nelle esperienze fatte con materiale raccolto durante l'inverno e sul principio della primavera. Nelle due esperienze invece, eseguite nell' estate e nell'autunno, gli estratti alcoolici inoculati a cavie e a cani, diedero luogo, specialmente nell' autunno, a dei fenomeni d'intossicamento grave e a caratteri convulsivi.

Dai risultati di queste esperienze, quindi, risulterebbe già che la mela rappresenta un *substratum* poco favorevole al *Penicillium glaucum* per la produzione di tossici; mentre il limone rappresenta un terreno più adatto. Sono esperienze naturalmente grossolane, ma che acquistano valore, come vedremo più avanti, perchè i loro risultati concordano con quelli di altre analoghe e compiute con più rigore di tecnica. Non è dei singoli risultati, ma del complesso di essi che noi dovremo tener conto anche in questo caso.

Esperienze sullo stracchino di Gorgonzola.

Avendo dovuto rinunciare per le difficoltà di tecnica alla estrazione di tossici specifici dello stracchino di Gorgonzola invaso da *Penicillium glaucum*, mi sono limitato a studiarne il potere tossico sottoponendo degli animali alla nutrizione dello stracchino stesso.

Due cani del peso rispettivo di 8500 e di 12040 gr. vennero, nello scorso inverno, sottoposti all' alimentazione esclusiva di stracchino di Gorgonzola vecchio (di oltre un anno di stagionatura) e che risultava diffusamente invaso da *Penicillium glaucum*. Lo stracchino era somministrato ai cani a volontà; cosicchè gli animali nei primi giorni ne mangiarono in abbondanza, da 350 a 450 gr. In seguito però la quantità giornaliera di stracchino consumato andò man mano diminuendo; fino a che negli ultimi giorni gli animali si rifiutarono affatto di mangiarne.

Di questi cani, il primo morì al 9° e il secondo al 13° giorno di alimentazione, con una rispettiva diminuzione di peso di 2040 e di 3700 gr.

Gli animali durante l'esperimento non presentarono mai fenomeni di eccitamento neuro-muscolare, ma bensì scariche diarroiche e fenomeni di depressione progressiva, molto analoghi a quelli che si osservano in seguito all' iniezione di tossici pellagrogeni

d' azione deprimente e paralizzante. Gli animali in questo periodo bevettero molto acqua e morirono in un vero stato comatoso.

All' autopsia non si riscontrò che congestione del tubo gastroenterico, la quale era assai intensa alla mucosa gastrica e un po' meno a quella intestinale.

Contemporaneamente furono sottoposti altri due cani del peso di 7000 e 7500 gr. alla nutrizione esclusiva di stracchino preparato di fresco, e precisamente dello stracchino che passa sotto il nome di crescienza e che si prepara specialmente in Lombardia durante l' inverno.

Anche in questo caso lo stracchino era somministrato a volontà agli animali, che ne consumarono da 300 a 400 gr. circa al giorno in quasi tutto il periodo di esperimento. Nei primi 10 giorni i cani si mantennero in ottime condizioni generali; ma dopo cominciarono a deperire e a diminuire di peso. Il deperimento diventò progressivo, per quanto assai lento; così che gli animali entrarono presto in uno stato di accentuata cachessia, ma senza presentare fenomeni d'intossicamento specifico. Uno dei cani morì dopo 51 e l' altro dopo 63 giorni, con una perdita rispettiva di 3700 e di 5060 gr. in peso.

All'autopsia non si riscontrò che uno stato di anemia generale profonda, assai accentuata al tubo gastro-enterico: reperto questo di carattere opposto a quello avuto nei due primi cani.

I due primi cani, quelli, cioè, nutriti con stracchino di Gorgonzola invaso abbondantemente da *Penicillium glaucum*, morirono quindi coi fenomeni di un intossicamento a carattere depressivo nel periodo di 9-13 giorni, e all'autopsia il reperto (intensa congestione della mucosa gastro-intestinale) corrispose perfettamente a quello che si riscontra in animali morti per ingestione di tossici pellagrogeni. Gli altri due cani, invece, quelli nutriti con stracchino preparato di recente e senza il fungo suddetto, morirono invece in stato marasmatico dopo 51-63 giorni di alimentazione e all' autopsia non presentarono che i caratteri di una prolungata inanizione (anemia generale).

Nel primo caso gli animali sono morti, in poche parole, per azione di un tossico; mentre nel secondo sono morti probabilmente per inanizione.

Lo stracchino di Gorgonzola, caratteristico per la presenza dell' ifomiceta, contiene perciò dei veleni d' azione deprimente

molto analoghi a quelli che posseggono i parassiti pellagrogeni in determinate condizioni a noi non ancora ben conosciute.

Esperienze eseguite con sostanze alimentari artificialmente infettate.

Le sostanze alimentari scelte per la preparazione di terreni colturali furono: le farine di *mais*, di frumento e di castagne, le patate, le mele e i limoni. La farina di frumento fu usofruita sotto forma di pane, quella di *mais* e di castagne sotto forma di polenta.

Il pane, la polenta, le patate e i limoni vennero distribuiti affettati in grosse *Erlenmeyer* nella quantità di 250 gr. e senza altro sterilizzati all' autoclave. I limoni però, prima della sterilizzazione, furono lievemente spremuti per facilitare lo sviluppo delle muffe. Le mele furono invece usofruite sotto forma di *purée*.

Tre varietà di *Penicillium glaucum* coltivate contemporaneamente sui sopra detti terreni colturali e su liquido Raulin servirono per la determinazione del potere tossico in rapporto con i diversi substrati nutritivi.

Le colture furono fatte sviluppare in ogni epoca dell' anno a temperatura ambiente. Nei mesi freddi però, cioè nei mesi di Dicembre e di Marzo, come si vedrà più avanti, le esperienze furono ripetute anche con colture fatte sviluppare alla temperatura costante di 19°-20°. Le colture, tranne quelle tenute a temperatura ambiente nei mesi freddi, crebbero sempre rigogliose su tutti i mezzi colturali. La prima varietà di P. g. presentò sempre un feltro di color verde cupo più o meno intenso; la seconda e la terza varietà presentarono invece un feltro variabile tra il color grigio ferro e il verde terriccio. Assai più lente, meno rigogliose, con feltro sbiadito e poco sporificato crebbero invece queste tre varietà sui vari mezzi colturali alla temperatura ambiente durante i mesi freddi.

La superficie inferiore della patina in qualsiasi epoca dell'anno e su qualsiasi mezzo nutritivo, nella 1ª varietà si mantenne sempre di color bianco cretaceo e nella 2ª si presentò ora di color giallo limone ora giallo arancio; mentre nella 3ª si presentò di un color rosso mattone nei mesi caldi e di un color feccia di vino nei mesi invernali, sia a temperatura ambiente, che a quella della stufa.

Non essendo sempre facile separare il fungo dai diversi mezzi colturali, questa volta l' estrazione alcoolica del tossico fu fatta dalla patina e dal mezzo colturale insieme e per ogni singolo caso l' estratto venne sperimentato in parte su un cane e in parte sopra una cavia.

Dall' Ottobre 1906 a quello 1907 le esperienze furono ripetute 8 volte nell' ordine della I[a] tabella qui annessa, nella quale sono segnate le singole date in cui vennero fatti gli estratti alcoolici e le iniezioni negli animali.

Per brevità poi tralascio qui di descrivere le singole esperienze e senz' altro riassumo nella tabella sopradetta i risultati delle varie iniezioni fatte negli animali coi diversi estratti alcoolici, limitandomi ad indicare colla lettera T i casi in cui l' estratto ebbe un' azione sugli animali evidentemente tossica con fenomeni tetaniformi, e colla lettera D i casi in cui ebbe un' azione evidentemente tossica, ma con fenomeni di depressione.

I risultati designati con queste due lettere majuscole corrispondono a fenomeni d' intossicamento intenso e presso a che eguali nei due animali di prova (cane e cavia), animali che di solito morirono nel periodo variabile da poche ore a 2-3 giorni.

Nei casi in cui uno o entrambi gli animali di prova ebbero a presentare uno stato d' intossicamento non molto grave e transitorio, a seconda dei sintomi che predominarono, tetaniformi o deprimenti, i risultati sono ancora indicati nella tabella I[a] colle rispettive lettere majuscole T e D, ma seguite queste dalla lettera minuscla l.

Nei casi infine in cui le iniezioni nei due animali non diedero luogo ad alcun fenomeno di intossicamento, i risultati sono indicati colla cifra 0.

Le colture venivano trapiantate ogni due mesi e le seminagioni per le singole esperienze erano fatte dai trapianti più recenti.

TABELLA I. — Risultati complessivi delle iniezioni fatte negli animali con
di *Penicillium glaucum*, coltivate sui diversi

TERRENO COLTURALE	OTTOBRE 2-1906 temperatura ambiente			NOVEMBRE 5-1906 temperatura ambiente			DICEMBRE 15-1906 temperatura 19°			DICEMBRE 27-1906 temperatura ambiente		
	P. gl. var.			*P. gl.* var.			*P. gl.* var.			*P. gl.* var		
	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III
1. Liquido Raulin . .	D.	T.	T.	O.	O.	T.	D.	O.	D.l.	O.	O.	O
2 Pane frumento. . .	D.	D.	T.	D.l.	D.l.	D.	O.	D.l.	D.	O.	O.	D.l.
3. Polenta *mais* . . .	O.	D.	D.l.	O.	D.	O.	O.	D.	O.	O.	D.l.	O.
4. Polenta castagne . .	D.	D.	T.l.	D.	O.	T.l.	O.	O.	O.	O.	O.	O.
5. Patate	D.	T.l.	D.l.	D.l.	D.	O.	O.	D.	O.	O.	O.	O.
6. Mele	D.l.	D.	D.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.
7. Limoni	T.	T.	T.	O.	T.	T.	D.l.	D.l.	D.	O.	O.	D.l.

estratti alcoolici ottenuti nelle singole esperienze eseguite con 3 varietà
terreni nutritivi nelle diverse epoche dell' anno.

MARZO 2-1907 temperatura 19°			MARZO 17-1907 temperatura ambiente			MAGGIO 1-1907 temperatura ambiente			GIUGNO 21-1907 temperatura ambiente			AGOSTO 3-1907 temperatura ambiente			OTTOBRE 7-1907 temperatura ambiente		
P. gl. var.			*P. gl.* var.			*P. gl.* var.			*P. gl.* var.			*P. gl.* var			*P. gl.* var.		
I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III	I.	II	III.	I.	II.	III.	I	II.	III.
D.	D.	D.l.	O.	D.	O.	O.	O.	D.l.	D.l.	D l.	T.	O.	T.	O.	T.	T.	O.
D.	O.	D.	D.l.	O.	D.l.	O.	T.	O.	D.	D l.	T.	O.	T.l.	O.	T.l.	T.l.	O.
O.	T.l.	D.l.	O.	O.	O.	O.	T.	O.	O.	T.l.	O.	O.	T.	T.l.	T.	T.l.	O.
T.	T.	O.	D.l.	T.	O.	O.	T.	O	D.l.	D.l.	D.	T.l.	T.	D.l.	T.	T.	D.l.
O.	T.	O.	O.	O.	O.	O.	T.	O.	O.	D.l.	D.	O.	T.	O.	T.	T.	O.
D.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	D.l.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	D.	T.l.	D.l.
D.l.	T.l.	D.l.	O.	T.l.	O.	O.	T.	D.l.	D.l.	T.	D.l.	O.	O.	O.	D.	D.l.	D.l.

Ecco ora quanto credo che si possa dedurre dai risultati riassunti nella tabella 1ª sulla tossicità del *Penicillium glaucum* in rapporto alle diverse sostanze nutritive e alle stagioni.

L' ifomiceta anzitutto, pur crescendo sempre rigoglioso sulle diverse sostanze alimentari usate (pane di frumento, polenta di *mais* e di castagne, patate, mele e limoni), non sempre ha prodotto dei tossici specifici. Sulle mele, p. es., crebbe quasi sempre atossico; mentre sulle altre sostanze colturali in complesso si presentò più tossico che atossico. Dobbiamo quindi ammettere che tutte le suddette sostanze, tranne le mele, rappresentino degli ottimi terreni colturali, sui quali crescendo il *Penicillium glaucum* può elaborare dei tossici pellagrogeni.

Se però diamo uno sguardo complessivo al numero delle volte in cui questo ifomiceta crebbe tossico oppure atossico sulle singole sostanze alimentari, vediamo come tra queste alcune, specialmente il limone e il pane di frumento, risultino in modo evidente dei terreni colturali più adatti per la produzione di tossici, che le altre (polenta di *mais* e di castagne e patate). Lo stesso liquido Raulin risulterebbe meno adatto del limone e del frumento.

Sopra 30 esperienze eseguite con ciascuno dei suddetti mezzi colturali abbiamo infatti che sul limone l'ifomiceta crebbe atossico solo 9 volte e sul pane di frumento 10 volte; mentre sulle altre sostanze alimentari il numero delle volte in cui il fungo crebbe atossico oscilla da 11 a 22.

Nella tabella II.ª qui annessa, nella quale riporto le percentuali complessive delle volte in cui le tre varietà di *Penicillium glaucum*, cresciute sui singoli terreni colturali, diedero dei tossici d' azione tetanizzante o deprimente, e le percentuali delle volte in cui crebbero perfettamente atossiche durante il periodo di un anno, ci dà un' idea esatta di questa notevole oscillazione del potere tossico in rapporto alla natura del mezzo colturale.

TABELLA II. - Percentuali complessive dei risultati positivi e negativi ottenuti colle singole sostanze alimentari durante il periodo di un anno.

	Risultati positivi	Risultati negativi
1. Liquido Raulin	56,66 %	43,33 %
2. Pane di frumento	66,66 %	33,34 %
3. Polenta di *mais*	43,34 %	56,66 %
4. Polenta di castagne	63,33 %	36,67 %
5. Patate	43,33 %	56,66 %
6. Mele	26,66 %	73,34 %
7. Limoni	70,00 %	30,00 %

Per ciò che può riguardare l'importanza pratica di queste osservazioni, faccio notare solamente come il *mais*, anche usofruito come polenta, risulti tra le sostanze alimentari sperimentate uno dei terreni colturali meno adatto al *P. gl.* per la produzione dei tossici; il che viene una volta ancora a dimostrare quanto erroneo sia il concetto di chi non può ammettere pellagra indipendentemente da questo cereale.

Per quanto riguarda la natura del tossico elaborato dal *Penicillium glaucum*, cioè tossico d'azione tetanizzante (T), o tossico d'azione deprimente (D), merita poi d'esser notato come in genere prevalga il secondo al primo. Inoltre esiste anche un rapporto, se non costante, però abbastanza frequente, tra la natura del tossico e il mezzo nutritivo su cui il fungo si è sviluppato, e a tale proposito faccio osservare come di solito il tossico di azione eccitante e tetanizzante (T) si ottenne di preferenza su quelle sostanze alimentari che in complesso risultarono anche le più adatte per l'elaborazione dei tossici in genere. Così, p. es., sul limone 9 volte le colture ci diedero tossici T e 12 volte tossici D; mentre sulle mele 1 sola volta le colture diedero

tossici T e 7 volte tossici D. Il limone appare ora appunto, come dissi già, tra i mezzi culturali usati il più adatto per la produzione dei tossici: la mela il mezzo meno adatto.

I tossici d' azione D prevalgono quindi quando la natura del terreno colturale è poco adatta per l' elaborazione dei tossici in genere.

Nella III[a] tabella riproduco separatamente il numero delle volte in cui l' estratto alcoolico delle diverse colture apparve d' azione tossica T oppure D.

TABELLA III. - Risultati positivi ottenuti colle singole sostanze alimentari durante il periodo d' esperimento e divisi in casi di tossici d' azione tetanizzante (T) e in casi di tossici d' azione deprimente (D).

	Tossici d' azione T.	Tossici d' azione D.
1. Liquido Raulin	7	10
2. Pane frumento	6	14
3. Polenta *mais*	7	6
4. Polenta castagne	10	9
5. Patate	6	7
6. Mele	1	7
7. Limoni	9	12

Non tutte le varietà di *Penicillium glaucum* nella produzione dei tossici si comportarono però in modo eguale sui diversi terreni colturali, ma presentarono a tale riguardo diversità così notevoli tra loro, che meritano qui la nostra singolare attenzione. I nostri reperti da questo punto di vista spiegano poi una volta ancora le conclusioni contradittorie a cui giunsero spesso gli autori che pretesero studiare le proprietà tossiche di questa muffa, sperimentando con una sola varietà.

Così, riferendoci ai risultati complessivi esposti nella tabella 1ª, noi vediamo anzi tutto che nelle esperienze eseguite durante il periodo di un anno con ciascuna delle tre varietà di *Penicillium glaucum*, la 1ª di queste dà 30 risultati positivi, e 40 risultati negativi; la 2ª varietà dà 47 risultati positivi e 23 negativi; la 3ª varietà 34 risultati positivi e 26 negativi.

Le oscillazioni nella tossicità degli estratti tra varietà e varietà di *Penicillium glaucum* sono ancor più notevoli se queste vengano considerate in rapporto a un mezzo nutritivo di natura costante.

Infatti riferendoci sempre ai risultati esposti nella tabella 1ª, noi vediamo assai di sovente che p. es. sono positivi quelli di una varietà di *Penicillium glaucum* coltivato su un determinato mezzo nutritivo; mentre son negativi i risultati delle altre due varietà del fungo pur coltivato nella stessa epoca e sul medesimo mezzo nutritivo.

Una perfetta concordanza dei risultati positivi avuti nelle singole esperienze fatte colle tre varietà del fungo, cresciuto anche sul medesimo mezzo colturale, costituisce un fatto molto raro; mentre assai di frequente abbiamo il caso di coincidenze perfette nei risultati negativi; di colture, cioè, cresciute sullo stesso mezzo nutritivo e nella stessa epoca, ma che rimangono innocue per tutte e tre le varietà.

Questa coincidenza dei risultati negativi si osserva prevalentemente nelle esperienze fatte in determinate epoche dell' anno; ma su ciò ritorneremo più avanti, trattando dei rapporti tra tossicità e stagioni.

Qui basti rilevare come le proprietà tossiche anche di una determinata specie di muffa possono notevolmente mutare da campione a campione, da varietà a varietà, pur mantenendosi costanti il mezzo nutritivo e le condizioni d' ambiente (temperatura, ecc.).

Tali variazioni nel potere tossico delle singole varietà del fungo, appaiono ancora più esagerate se si considera la natura del tossico stesso, se, cioè, si raffrontano tra di loro il numero delle volte in cui il tossico delle singole varietà fu d' azione eccitante oppure d' azione deprimente.

La 1.ª varietà sopra 30 risultati positivi ci dà 8 volte tossici T e 22 volte tossici D; la 2.ª varietà sopra 47 risultati positivi,

27 volte ci dà tossici T e 20 volte tossici D; la 3.ª varietà, sopra 34 risultati positivi, 10 volte ci dà tossici T e 24 tossici D.

Faccio poi qui notare che i tossici d'azione T predominano in modo singolare nella varietà che diede maggiori risultati positivi, cioè nella varietà 2.ª; mentre i tossici di azione D predominano nelle varietà 1.ª e 3.ª, che apparvero nel complesso dei loro risultati meno tossiche dell'altra.

Anche in questo caso quindi sembrerebbe che la predominanza dei tossici d'azione T sia in rapporto diretto colla potenzialità tossica della muffa; mentre la predominanza dei tossici d'azione D sembrerebbe in rapporto inverso.

Ho voluto quì accennare a questo rapporto tra la natura del tossico e la potenzialità tossica, perchè fu da me già notata anche in altre specie di muffe.

Mi rimane infine a dire delle oscillazioni nella tossicità degli estratti alcoolici nelle varie esperienze esposte nella tabella 1ª e in rapporto colle varie stagioni in cui queste vennero eseguite.

Per brevità riporto senz'altro nella tabella IV. le percentuali dei risultati complessivi positivi e di quelli negativi, ottenuti colle iniezioni degli estratti alcoolici delle colture fatte colle tre varietà di *Penicillium glaucum* nei vari mesi d'esperimento.

TABELLA IV. - Percentuali complessive dei risultati positivi e negativi ottenuti nei singoli mesi colle diverse sostanze alimentari.

	Risultati positivi	Risultati negativi
1. - Ottobre 1906.		
temperatura ambiente	95,23 %	4,77 %
2. - Novembre 1906.		
temperatura ambiente	52,38 %	47,62 %
3. - Dicembre 1906.		
temperatura ambiente	14,28 %	85,72 %
temperatura costante 19°	42,85 %	57,15 %

	Risultati positivi	Risultati negativi
4. - Marzo 1907.		
temperatura ambiente	28,57 %	71,43 %
temperatura costante 19°	66,66 %	33,34 %
5. - Maggio 1907.		
temperatura ambiente	38,09 %	61,91 %
6. Giugno 1907.		
temperatura ambiente	76,19 %	23,81 %
7. - Agosto 1907.		
temperatura ambiente	38,09 %	61,91 %
8. Ottobre 1907.		
temperatura ambiente	80,95 %	19,05 %

Da questa tabella risulta evidentemente che nei diversi mesi dell'anno le oscillazioni della tossicità sono notevolissime se si considerano i risultati avuti da culture cresciute alla temperatura ambiente. Esse però persistono, sebbene un po' meno accentuate, se anche si calcolano i risultati avuti durante la stagione invernale con muffe fatte crescere alla stufa.

Il massimo dei risultati positivi corrisponde poi ai due mesi di Ottobre 1906 e 1907 e al Giugno 1907; mentre il minimo corrisponde ai mesi di Dicembre 1906 e Marzo 1907, specialmente se si tien conto dei risultati avuti dalle colture cresciute a temperatura ambiente. Evidentemente però in questi due ultimi mesi, in special modo nel Dicembre, i risultati positivi corrispondono sempre al minimo anche se si vuol tener conto di quelli avuti con colture cresciute a 19-20°.

L' influenza delle stagioni quindi risulta provata anche dai risultati complessivi di queste ricerche eseguite con mezzi colturali tanto diversi ed opposti e con tre varietà di *Penicillium glaucum*.

L' influenza che esercita la natura del mezzo colturale sulla tossicità della muffa passa pertanto in questo caso in

seconda linea; perchè noi osserviamo che nei mesi corrispondenti al massimo complessivo dei risultati positivi, l'ifomiceta è tossico tanto sui mezzi colturali più adatti, quanto su quelli meno adatti per la produzione del tossico. Viceversa nei mesi corrispondenti al minimo dei risultati negativi l'ifomiceta rimane atossico sulla massima parte dei diversi mezzi nutritivi usati, compresi quelli più adatti.

Ripeto, quindi, l'influenza delle stagioni sulla tossicità di queste muffe appare quì superiore di quella che può sulla medesima esercitare la natura diversa ed opposta degli stessi mezzi colturali da me usati.

In termini generali e salvo alcune eccezioni che vedremo più avanti, osserviamo ancora che il maggior numero di casi con tossici d'azione eccitante e tetanizzante corrisponde ai mesi di massima produzione tossica delle muffe; mentre il maggior numero dei casi con tossici d'azione deprimente e paralizzante corrisponde ai mesi di minima produzione tossica. Si confrontino a tale proposito i risultati avuti, p. es., nel mese di Dicembre 1906 con quelli avuti nel mese di Ottobre del 1906 e del 1907. Nei primi mancano affatto casi con tossici d'azione T, se anche si tien conto di quelli avuti con colture cresciute alla stufa; mentre il maggior numero dei casi con tossici d'azione T si ha nei due mesi di Ottobre (1906-07).

Il tossico di tipica azione T corrisponderebbe quindi ancora a stati di attività tossica massima, e quello d'azione D corrisponderebbe invece a stati di attività tossica minima della muffa.

Su questo fenomeno che vediamo ora ripetersi, anche indipendentemente dalla natura del mezzo colturale, mi permetto di richiamare l'attenzione; perchè, secondo me, potrebbe servire a dimostrare l'influenza delle stagioni sul metabolismo delle muffe anche nei suoi più minuti particolari.

Siccome però nei risultati complessivi avuti colle tre varietà nei singoli mesi, questo rapporto tra la natura del tossico elaborato e l'attività tossica dell'ifomiceta, non apparve costante; così, dato qui anche il numero limitato dei campioni di *Penicillium glaucum* su cui si è sperimentato, non mi credo autorizzato di trarre a tale riguardo delle conclusioni.

Rimane a ogni modo dimostrato da queste esperienze come la natura dei tossici elaborati dal *Penicillium glaucum* possa pure variare notevolmente da stagione a stagione, anche indipendentemente dai mezzi colturali.

Nella tabella V^a^ riporto il numero complessivo dei risultati positivi, divisi in casi con tossici d' azione T e in casi con tossici d' azione D, ottenuti nei vari periodi in cui furono fatte le esperienze.

A spiegazione di questi risultati ottenuti con mezzi colturali di natura così diversa ed opposta, eppure così concordi nelle varie epoche dell' anno, non saprei ora quale altro fattore invocare, al di fuori di un' influenza delle stagioni sulla muffa in esame.

Dico risultati concordi riferendomi sempre al loro complesso e pur sapendo che in mezzo a loro, anche questa volta, esistono dei casi isolati inesplicabili e in apparente contraddizione col concetto nostro sul rapporto tra le stagioni l' attività tossica delle suddette muffe, come sarebbero p. es. i casi negativi verificatisi nei mesi più favorevoli anche con colture fatte sui mezzi nutritivi più addatti per la elaborazione dei tossici (liquido Raulin, pane di frumento).

Io considero però questi ultimi come delle vere eccezioni alla regola generale, dei veri capricci della natura, i quali, conformemente a quanto già dissi in principio di questa memoria, non possono infirmare una legge biologica, che scaturisce da un numero così considerevole di fatti sperimentali e in perfetta armonia col decorso clinico della stessa endemia pellagrosa.

La sola temperatura, infine, la quale, secondo il Paladino, dovrebbe costituire l' unico fattore possibile di oscillazione nella tossicità delle muffe pellagrogene nelle diverse stagioni, anche questa volta non basta a spiegare i nostri risultati. La temperatura ambiente infatti, nei mesi di Ottobre 1906-07 durante le esperienze oscillò tra 18°-20°, e le culture nel Dicembre furono appunto ripetute, come vedemmo più sopra, oltrechè a temperatura ambiente, anche a quella costante di 19°-20°. Con tutto ciò i risultati che si ebbero in queste due epoche furono sempre diversi e opposti.

Le oscillazioni dell' attività tossica del *Penicillium glaucum* in rapporto alle diverse stagioni appaiono poi ancor più evidenti in questo caso se si prendono in esame i risultati avuti colle singole varietà del fungo. Ricorderò a sostegno di ciò come vi furono nelle nostre esperienze delle epoche in cui una determinata varietà rimase perfettamente atossica su tutti i nutritivi; mentre vi furono altre epoche in cui la stessa varietà apparve sempre tossica.

TABELLA V. - Risultati positivi ottenuti nei singoli mesi dell'anno e distinti in casi di tossici d'azione tetanizzante (T) e in casi di tossici d'azione deprimente (D).

	Tossici d'azione tetanizzante T.	Tossici d'azione deprimente D.
1. Ottobre 1906.		
temperatura ambiente	8	12
2. Novembre 1906.		
temperatura ambiente	4	7
3. Dicembre 1906.		
temperatura ambiente	0	3
temperatura 20°	0	9
4. Marzo 1907.		
temperatura ambiente	2	4
temperatura 20°	4	9
5. Maggio 1907.		
temperatura ambiente	5	3
6. Giugno 1907.		
temperatura ambiente	4	11
7. Agosto 1907.		
temperatura ambiente	7	1
8. Ottobre 1907.		
temperatura ambiente	10	6

La varietà 1.ª p. es., che crebbe sempre rigogliosa su tutti i terreni culturali usati, rimase tuttavia quasi sempre atossica dal Dicembre 1906 all'Agosto 1907; mentre nel successivo mese di Ottobre apparve dotata delle più tipiche proprietà tossiche su tutti i terreni di cultura.

La varietà 2.ª invece presentò oscillazioni meno accentuate della 1.ª; ma pure sempre abbastanza notevoli. Basta perciò confrontare i frequenti risultati negativi ottenuti nel Dicembre e nel Marzo, specialmente colle colture cresciute alla temperatura ambiente, coi risultati sempre positivi ottenuti invece, p. es., nei due mesi di Ottobre. Simili esempi di diversità individuali li vediamo anche nella varietà 3.ª.

Se anche la temperatura, come già dissi per la natura dei mezzi nutritivi, non basta ora di per sè a spiegare i diversi risultati ottenuti; quale altro coefficiente, ripeto, potremo noi invocare in questi casi se non quello di un' influenza esercitata sull' attività tossica delle muffe da tutto quel complesso di fenomeni che costituiscono le varie stagioni dell' anno?

Solo a dimostrazione contraria, solo quando, cioè, i risultati diversi ed opposti che si ottengono nelle varie epoche dell' anno potranno esser spiegati altrimenti che attribuendo all' ambiente e particolarmente alle stagioni un' influenza diretta sul metabolismo delle muffe, noi potremo prendere in considerazione le ipotetiche obbiezioni mosseci dalla scuola del Gosio e in modo speciale dal Paladino.

Il concetto dell' influenza dell' ambiente sulla tossicità delle muffe deve però essere inteso nei limiti del verosimile e del buon senso; ed è ora entro questi stessi limiti che m' auguro si mantenga la critica dei miei egregi contradditori.

Tenendomi ora strettamente all' obbiettività dei fatti su esposti, ecco pertanto le conclusioni che da essi mi sento autorizzato a trarre.

CONCLUSIONI

1. Gli estratti alcoolici del *Penicillium glaucum* cresciuto in natura e in diverse epoche dell' anno sulle mele e sui limoni, ora riescono perfettamente innocui agli animali nei quali vengono iniettati anche in quantità considerevoli; ora invece danno luogo a fenomeni d' intossicamento analoghi a quelli che si ottengono dagli estratti fatti da colture pure del suddetto ifomiceta.

2. Lo stracchino di Gorgonzola, dal tipico aspetto marmorizzato per la presenza del *Penicillium glaucum*, se somministrato ai cani quale alimento, determina in questi un quadro d' intossicazione grave e sub-acuta, caratterizzata da fenomeni paralizzanti e depressivi, molto analoghi a quelli che si osservano coi tossici pellagrogeni ch' io già descrissi come d'azione deprimente e paralizzante.

3. Gli estratti alcoolici di colture pure di *Penicillium glaucum*, cresciuto in varie epoche dell' anno e contemporaneamente sopra substrati nutritivi più svariati (pane di frumento, polenta di mais, polenta di castagne, patate, limoni, mele e liquido Raulin) ora presentano un' azione nettamente tossica « sia a caratteri tipici eccitanti e tetanizzanti, sia a caratteri tipici deprimenti e paralizzanti », ora invece risultano perfettamente innocui.

4. L' attività tossica del *Penicillium glaucum* varia notevolmente colla natura del substrato nutritivo. Il limone e il pane di frumento risultano tra i terreni colturali più adatti al *Penicillium glaucum* per la produzione dei tossici specifici. Meno adatti risultano le pàtate, la polenta di castagne e la polenta di *mais;* meno ancora il *purée* di mele.

5. Non tutte le varietà di *Penicillium glaucum* crescono sui diversi terreni colturali suddetti colla stessa attività tossica; ma possono presentare in proposito delle notevoli variazioni.

I tossici d' azione eccitante e tetanizzante sono elaborati prevalentemente quando l' ifomiceta cresce su quei terreni colturali, sui quali dimostra in genere una maggiore attività tossica (p. es. il limone); mentre i tossici d' azione deprimente e paralizzante sono elaborati prevalentemente su quei terreni colturali, sui quali il fungo dimostra in genere una minore attività tossica (p. es. le mele).

6. L' attività tossica del *Penicillium glaucum* varia ancora in modo più accentuato da stagione a stagione, anche indipendentemente dalla natura dei mezzi colturali.

In determinati periodi dell' anno, specialmente nell' inverno, il *Penicillium glaucum*, al nostro clima, cresciuto anche sulle sostanze nutritive più adatte per l' elaborazione dei tossici (limone, pane di frumento) si presenta prevalentemente atossico; mentre

in altri periodi dell' anno, specialmente nella primavera e nel-autunno, l' ifomiceta cresciuto sui diversi terreni colturali riesce prevalentemente tossico.

I tossici d' azione tetanizzante sono in genere elaborati prevalentemente nelle epoche dell' anno che corrispondono al massimo di tossicità della muffa.

Non in tutte le varietà di *Penicillium glaucum* infine, appare una perfetta coincidenza di tempo nel loro massimo e minimo di attività tossica rispetto alle varie epoche dell' anno; ma esistono a tale proposito variazioni anche notevoli, che non possono essere spiegate che come fenomeni di reazioni individuali alla stessa influenza delle stagioni.